

554, 238

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. Februar 2005 (24.02.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/017194 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/001821

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. August 2004 (13.08.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 38 123.6 15. August 2003 (15.08.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SCANBEC GMBH [DE/DE]; Weinbergweg 23, 06120 Halle (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BREITENSTEIN, Antje [DE/DE]; Schillerstrasse 29, 06114 Halle (DE). ROSILAINEN, Tarja [FI/FI]; Kandidite 3A8, FI-90510 Oulu (FI). NEUBAUER, Peter [DE/FI]; Variksenpolken 10, FI-90510 Oulu (FI).

(74) Anwalt: PAULING, Hans-Jürgen; Am Treff 1, 06124 Halle (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE DETECTION OF LEGIONELLA-TYPE BACTERIA

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON BAKTERIEN DER GATTUNG LEGIONELLA

(57) Abstract: The invention relates to methods for detecting legionella-type bacteria by means of the sandwich hybridization process at temperatures of 50 to 55 °C. According to the invention, newly developed oligonucleotides whose sequences allow the bacteria and the legionella type to be detected in a type-specific or species-specific manner are used as collector probes and detection probes for said detection method. The collector probes and detection probes can advantageously be interchanged for the type-specific and species-specific detection of legionella species. Moreover, the inventive method can be carried out for species-specific probes by means of combinations of oligonucleotides.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella mittels der SandwichHybridisierungs-Methode bei Temperaturen von 50-55 °C. Erfindungsgemäss werden für das Nachweiverfahren neu entwickelte Oligonukleotide als Fänger- und Nachweissonden eingesetzt, deren Sequenzen den Nachweis der Bakterien und Gattung Legionella gattungs-oder artspezifisch ermöglichen. Vorteilhaft ist die gegenseitige Austauschbarkeit der Fänger- und Nachweissonden bei art- und gattungsspezifischen Nachweisen von Legionella-Spezies. Außerdem ist das Nachweisverfahren mit Kombinationen von Oligonukleotiden für artspezifische Sonden durchführbar.

WO 2005/017194 A2



MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella mittels der Sandwich- Hybridisierungs-Methode.

Legionella spp. sind gram-negative, stäbchenförmige und fakultativ intrazelluläre Pathogene. Es werden mehr als 42 Spezies mit 64 Sero- Gruppen unterschieden.

Sie werden als intrazelluläre Parasiten von Amöben und Ciliaten normalerweise in wässriger Umgebung sowie in nassem Boden gefunden. Sie werden auch in oder an künstlich hergestellten Plätzen oder Produkten wie Kühltürmen, klinischen Beatmungs- Geräten, Whirlpools oder Duschen gefunden.

Der Mensch infiziert sich mit Legionellen nach dem Einatmen kontaminierter Aerosol- Tropfen aus den oben erwähnten Habitaten. In der Lunge befallen die Legionella-Bakterien Makrophagen und können eine Form der Lungenentzündung verursachen, bekannt als Legionärs-Krankheit. Die Symptome beginnen mit schwachem Husten, Unwohlsein, Muskelschmerzen, leichtem Fieber, sowie gastrointestinalen Störungen und steigern sich zu hohem Fieber, Alveolitis und Bronchitis. Legionella pneumophila ist der wichtigste Erreger für die Legionellose, aber auch andere Spezies der Gattung L. kommen als Krankheitserreger beim Menschen in Frage.

Zum Nachweis der Legionella-Spezies in Wasserproben sind aus der Literatur die Kultivierungs-Methode, auf Polymerase-Kettenreaktionen beruhende Methoden sowie die Verwendung monoklonaler Antikörper bekannt. Angewendet wird auch die Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden.

Weiter wurde aus der US 5.569.568 A die Anwendung der Sandwich- Hybridisierungs-Methode bekannt. Diese Methode basiert auf der Nutzung von zwei Oligonukleotid- Sonden - einer Fänger-Sonde und einer Nachweis-Sonde. Die Fänger- Sonde ist kovalent an einen festen Untergrund gebunden. Zunächst hybridisiert die zu untersuchende Ziel-Nukleinsäure bei spezifischen Temperaturen mit den beiden Sonden. Danach bindet die Ziel- Nukleinsäure und der Sondenkomplex an den festen Untergrund der Fänger-Sonde. Der Nachweis kann mit Fluoreszenz oder Chemilumineszenz, Farbreaktionen oder radioaktiven Markierungen erfolgen. Wichtig für den Erfolg dieser Methode sind die Eigenschaften der

Sonden für die jeweilige spezifische Hybridisierung. Das wird durch den bisherigen Stand der Technik nur teilweise gewährleistet.

Die Aufgabe der Erfindung besteht deshalb darin, neue gattungs- und artspezifische Oligonukleotide zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* herzustellen und zu verwenden.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, dass

- a) zum Nachweis der gesamten Gattung *Legionella* als Fängersonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CCTCCTCCCCACTGAAAGT-3' und als Nachweissonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CACTGTATGTCAAGGGTAGG;
- b) zum Nachweis von *Legionella pneumophila* als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-ATCTGACCGTCCCAGGTT-3' und als Nachweissonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-TTCGCCGCCCTCTGTATCG-3';
- c) zum Nachweis von *Legionella feelei* als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-GCGCCACTAACCTCATTCAT-3' und als Nachweissonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-TATACAACCACCTACGCACC-3' und
- d) zum Nachweis von *Legionella jordanis* als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CCACTCCTCCCCACTGAAAG-3' und als Nachweis-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CTTACGGTCCCCAGCTTTTT-3' verwendet werden und die Hybridisierung bei Temperaturen von fünfzig bis fünfundfünfzig Grad Celsius erfolgt.

Die wichtigsten Daten der neuen Oligonukleotid-Sonden sind in nachfolgender Tabelle 1 dargestellt.

Name der Sonde	Sequenz	Ziel- ..Spezies	Position in E.coli 16SrRNA	Sonde in der Sandwich- Hybridisierung	Spezifische Hybridisie- rungs-Temp.
legpneu 1	5'-TTCGCCGCCCTCTGTATCG-3'	L.	575-594	Nachweis	50°
legpneu 2	5'-ATCTGACCGTCCCAGGTT-3'	pneumo- phila	626-643	Fänger	

	legfeel 1	5'-GCGCCACTAACCTCATTTCAT-3' L.	840-859	Fänger	55°C
	legfeel 2	5'-TATACAACCACCTACGCACC-3' feelei	575-594	Nachweis	
	legjor 1	5'-CTTACGGTCCCCAGCTTTTT-3' L.	192-211	Nachweis	50°C
5	legjor 2	5'-CCACTCCTCCCCACTGAAAG-3' jordanis	435-454	Fänger	
	legall 11	5'- CCTCCTCCCCACTGAAAGT-3' Genus	433-451	Fänger	
	legall 22	5'- CACTGTATGTCAAGGGTAGG legionella	983-1001	Nachweis	50°C

- 10 Bei artspezifischen Nachweisen von Legionella-Spezies sind gemäß Patentanspruch 2 die Oligonukleotide für Fänger-Sonden und Nachweis-Sondeneineinander austauschbar.

Weiterhin werden die Nachweise von Bakterien der Gattung Legionella gemäß Patentanspruch 3 mit Kombinationen von Oligonukleotiden für gattungsspezifische Sonden und Oligonukleotiden für artspezi-
 15 fische Sonden vorgenommen.

Von Vorteil ist weiter, dass die neuen gattungs- und artspezifischen Oligonukleotid-Sonden alle für eine Hybridisierung bei Temperaturen von 50 -55°C entwickelt wurden. Damit sind Kombinationen von mehr als 2 Sonden möglich, welche die Voraussetzung für den Nachweis von mehr als 1 Legionella -Spezies
 20 in einem Test sind. Hierzu werden magnetische Beads mit verschiedenen zum Nachweis von einzelnen Legionella-Spezies Fänger-Sonden gemischt (Multiplex-Analyse) beispielsweise Fänger-Sonden zum Nachweis von L. p. mit Fänger-Sonden zum Nachweis von L. f. oder anderen in Kombination mit einer gattungsspezifischen Nachweis-Sonde.

- 25 Das erfindungsgemäße Verfahren wird im folgenden unter Hinweis auf die beigefügten Zeichnungen näher erläutert.

Figur 1 S. 8 zeigt eine schematische Darstellung der Sandwich-Hybridisierungs- Methode.

- 30 Dabei ist die Fänger-Sonde 1 mit Biotin 4 markiert; bindet an mit Streptavidin 5 ummantelte magnetische Kugeln (magnetic beads) 7. Nach erfolgter Hybridisierung der Ziel-Nukleinsäure mit den beiden Sonden 1 und 2 geschieht der Nachweis mit Alkalischer Phosphatase 6 die an die Digoxigenin-

markierte Nachweis-Sonde 2 über Anti DIG Fab Fragmente bindet. Der Nachweis des amplifizierten Fluoreszenz Signals kann durch ein Fluoreszenz-Lesegerät quantifiziert werden.

Eine weitere Nachweismöglichkeit ist die Erfassung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase durch elektrochemische Sensoren.

5

Zur Probenaufbereitung werden Gesamt-DNA-Proben verschiedener Legionella-Spezies verwendet. Die 16S ribosomale DNA (rDNA) wurde aus der Gesamt-DNA verschiedener Legionella-Spezies unter Verwendung der fD1 und rP2-Universal-Primer für die 16SrDNA mittels PCR amplifiziert. Der Promoter-Bereich der T7 Polymerase war im fD1 enthalten. In vitro transkribierten 166Sr RNA wurde von den entsprechenden PCR Produkten aus Legionella (16SrDNA) unter Verwendung des DIG RNA LabelingKit (SP6/T7) (Roche) oder des MAXIscrip-Kits / Ambion hergestellt.

10

15

Die Wirksamkeit der Oligonukleotid-Sonde wurde durch die Slot-Blot-Methode getestet. In vitro transkribierte 16SrRNA (Ribosomale der kleinen Untereinheit der Bakterien-Ribosomen) wurde als Ziel-Molekül verwendet.

Die Slot-Blot-Hybridisierungen wurden entsprechend des Protokolls des DIG System User's guide for Filter Hybridization, Boehringer Mannheim (1995) durchgeführt. 1000 fmol in vitro transkribierter 16SrRNA verschiedenner Legionella-Spezies wurden in RNA-Lösungs-Puffer (DEPC-HO, 20xSC, Formaldehyd (5:3:2) präpariert und für 10 Minuten bei 65°C denaturiert. Anschließend werden die Proben mittels eines Vakuum-Slot-Blotter (Bio-Rad) auf eine positive geladene Nylon-Membran (Hybond-N) aufgebracht. Diese Membran war vor und nach dem Blotten mit 20xSSC(3MNaCl und 300 mM Natriumcitrat pH 7,0) gewaschen worden. Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit UV-Licht (für 2 Minuten an die Membran gebunden.

25

Die Prä-Hybridisierung wurde in hoch-SDS-Puffer (7%SDS; 50% Formaldehyd, 5x SSC, 2% Blocking Reagent(Roche), 50mM Natriumphosphat pH 7,= und 0,1 % Laurylsarcosin) für zwei Stunden bei Hybridisierungs-Temperatur durchgeführt Danach erfolgte die Hybridisierung über Nacht in Hoch-SDS-Puffer mit 100 pmol DIG markierter Oligonukleotid-Sonde bei 50-55°C abhängig von der Schmelztemperatur der Sonde. Die Proben wurden am 3'-Ende mit dem DIG Oligonucleotide 3'End

30

Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH) entsprechend des Protokolls des Herstellers mit Digoxigenin markiert.

5 Nach der Hybridisierung wurde die Membran zwei Mal mit 2x SSC; 0,1% SDS für 5 Minuten gewaschen, gefolgt von zweimaligen Waschen mit 0,1 x SSC; 0,1% SDS, 0,2 x SSC; 0,1% SDS oder 0,5 x SSC; 0,1% SDS für 20 Minuten bei Hybridisierungstemperatur, um die ungebundene Sonde zu entfernen. Anschließend wurde die Membran in Maleinsäure-Puffer (0,1 M Maleinsäure und 0,15 M NaCl, pH 7,5) mit 0,3% Tween 20™ für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindung der Alkalischen Phosphatase zu vermeiden. Die Membran wurde für 30 Minuten in Malein-
10 säure Puffer mit 0,1% Blocking Lösung (Roche) inkubiert. Anschließend wurde die Anti-Digoxigenin-Alkalische -Phosphatase (AP) 1: 20 000 in Maleinsäure-Puffer mit 1% Blocking Lösung verdünnt und die Membran in der Antikörper-Lösung 30 Minuten inkubiert. Die Membran wurde 2 mal mit Maleinsäure-Puffer mit 0,3% Tween 20 für 15 Minuten gewaschen und für 5 Minuten in Nachweis-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5 und 100 mM NaCl)¹- äquilibriert. Das als Substrat für die Alkalische
15 Phosphatase benutzte CDP-Star™ Substrat (Roche) wurde 1: 100 in Nachweis-Puffer verdünnt, auf die Oberfläche der Membran aufgetragen und in Plastik-Folie eingeschweißt für 10 Minuten inkubiert. Die Membran wurde exponiert (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech). Zeitraum war zuerst 1 Stunde und später 10 oder 5 Minuten um die Färbung des Hintergrundes zu reduzieren.

20 Die Ergebnisse der Slot-Blot-Test's zeigen folgendes.

1. Sonden zum Nachweis der Gattung Legionella

Die Sonde Legall 11 hybridisiert mit der in vitro transkribierten 16rRNA alle untersuchten Legionella Spezies (15 Arten – siehe Tabelle 2, S. 9). Die Bindung war spezifisch für alle Legionella- Spezies.

25 Die Sonde Legall 22 hybridisierte ebenfalls spezifisch mit der in vitro transkribierten 16SrRNA aller untersuchten Legionella- Spezies.

Beide Sonden sind für einen Nachweis der Gattung Legionella im Sand-Hybridisierungsnachweis mit Legall 11 als Fängersonde und Legall 22 als Nachweissonde geeignet. Die Hybridisierungstemperatur war 50°C.

30

2. Sonden zum Nachweis von Legionella pneumophila

Die Sonde Legpneu 1 hybridisierte mit der in vitro transkribierten 16SrRNA der Legionella pneumo-

phila Serogruppe 1 ATCC33152, Legionella pneumophila Serogruppe 6, Legionella pneumophila Philadelphia I JR32 WT und mit Legionella micdadei.

Die Sonde Legpneu 2 hybridisiert mit in vitro transkribierter 16S rRNA von Legionella pneumophila Philadelphia I JR32 WT. Diese Sonde ist hochspezifisch und kann als Fänger-Sonde mit der Legpneu1-Sonde in Sandwich-Hybridisierungs-Nachweisen verwendet werden. Die Hybridisierungstemperatur war 50°C.

3. Sonden zum Nachweis von Legionella feelei

Die Sonde Legfeel 1 hybridisiert nur mit der in vitro transkribierten 16S rRNA von Legionella feelei und ist spezifisch. Sie kann als Fänger-Sonde zusammen mit Legfeel2 zum Nachweis von Legionella feelei benutzt werden.

Die Sonde Legfeel2 hybridisierte nur mit der in vitro transkribierten 16S RNA von Legionella feelei und ist spezifisch. Sie kann als Nachweis-Sonde verwendet werden, weil sie eine niedrige Bindungseffizienz besitzt als die Sonde Legfeel1.

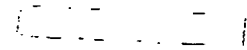
Diese beiden Legfeel-Sonden können zum Nachweis von Legionella feelei in Sandwich-Hybridisierungs-Ansätzen verwendet werden. Die spezifische Hybridisierungstemperatur beider Sonden war 55°C.

4. Sonden zum Nachweis von Legionella jordanis

Die Sonde Legjor 2 hybridisiert mit der in vitro transkribierten 16S rRNA von Legionella jordanis und Legionella feelei. Die Bindung mit der Legionella jordanis-Probe war spezifisch und die Bindung mit der Legionella feelei-Probe war unspezifisch. Diese Sonde kann als Nachweis-Sonde zusammen mit der Legjor1-Sonde verwendet werden.

Die Sonde Legjor 1 hybridisierte nur mit der in vitro transkribierten 16S rRNA von Legionella jordanis. Die Bindung dieser Sonde zum Zielmolekül war spezifisch. Die Sonde kann als Fänger-Sonde zusammen mit der Sonde Legjor2 verwendet werden. Die Hybridisierungstemperatur für beide Sonden war ebenfalls 55°C.

Die Vorteile der Erfindung bestehen darin, dass die neuen Oligonukleotide gattungs- und artspezifisch für die Sandwich-Hybridisierungsmethode besonders geeignet sind. Vorteilhaft wirkt sich weiter der Einsatz von Kombinationen der neuen Oligonukleotide aus. Möglich sind auch Kombinationen mit



anderen Oligonukleotid-Sonden z.B. für den Einsatz als Primer für PCR, fluoreszenzmarkiert für mikroskopische Nachweise, zur Fluoreszenzsandwichhybridisierung und zur Sandwich-Hybridisierung mit elektrischer Signalauslesung.

Tabelle 2 : Untersuchte Legionella Spezies

Legionella Spezies	SONDEN							
	Legall11	Legall22	Legpneu1	Legpneu2	Legfeel1	Legfeel2	Legjor2	Legjor1
<i>L. bozemanii</i>	0	0						
<i>L. dumoffii</i>	0	0						
<i>L. erythra</i>	0	0						
<i>L. feelei</i>	0	0			0	0	2	
<i>L. gormanii</i>	0	0						1
<i>L. hackeliae</i>	0	0						
<i>L. israelensis</i>	0	0						
<i>L. jordanis</i>	0	0					0	0
<i>L. longbeachae</i>	0	0						
<i>L. micdadei</i>	0	0	1					
<i>L. oakridgensis</i>	0	0						
<i>L.p. 1 ATCC 33152</i>	0	0	0	0				
<i>L.p. gorby WT</i>	0	0						
<i>L.p.philadelphia JR32 WT</i>	0	0	0	0				
<i>L.p.philadelphia</i> serogr. 6	0	0	0	0				
Hybridisierungstemp.	50	50	50	50	55	55	55	55
Waschpuffer	A	A	B	B	A	A	A	A

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella mittels der Sandwich-Hybridisierungs-Methode dadurch gekennzeichnet, dass
 - 5 a) gattungsspezifisch zum Nachweis der Gattung Legionella als Fängersonde ein Oligonukleotid der Sequenz
5'- CCTCCTCCCCACTGAAAGT- 3' und als Nachweissonde ein Oligonukleotid der Sequenz
5'- CACTGTATGTCAAGGGTAGG;
 - 10 b) artspezifisch zum Nachweis von Legionella pneumophila als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz
5'-ATCTGACCGTCCCAGGTT-3' und als Nachweis-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-
TTCGCCGCCCTCTGTATCG-3';
 - c) artspezifisch zum Nachweis von Legionella feelei als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz
15 5'-GCGCCA CTAACCTCATTAT-3' und als Nachweis-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz
5'-TATACAACCACCTACGCACC-3' und
 - d) artspezifisch zum Nachweis von Legionella jordanis als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz
5'-CCACTCCTCCCCACTGAAAG-3' und als Nachweis-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz
20 5'-CTTACGGTCCCCAGCTTTTT-3verwendet werden und die Hybridisierung bei Temperaturen von 50 bis 55°C erfolgt.
2. Verfahren gemäß Patentanspruch 1., gekennzeichnet dadurch, dass bei artspezifischen Nachweisen von Legionella-Spezies die Oligonukleotide für die Fänger-Sonden und Nachweis-Sonden gegeneinander austauschbar sind.
- 25 3. Verfahren gemäß Patentanspruch 1., dadurch gekennzeichnet, dass die Nachweise Kombinationen von Oligonukleotiden für gattungsspezifische Sonden und Oligonukleotiden für artspezifische Sonden vorgenommen werden.

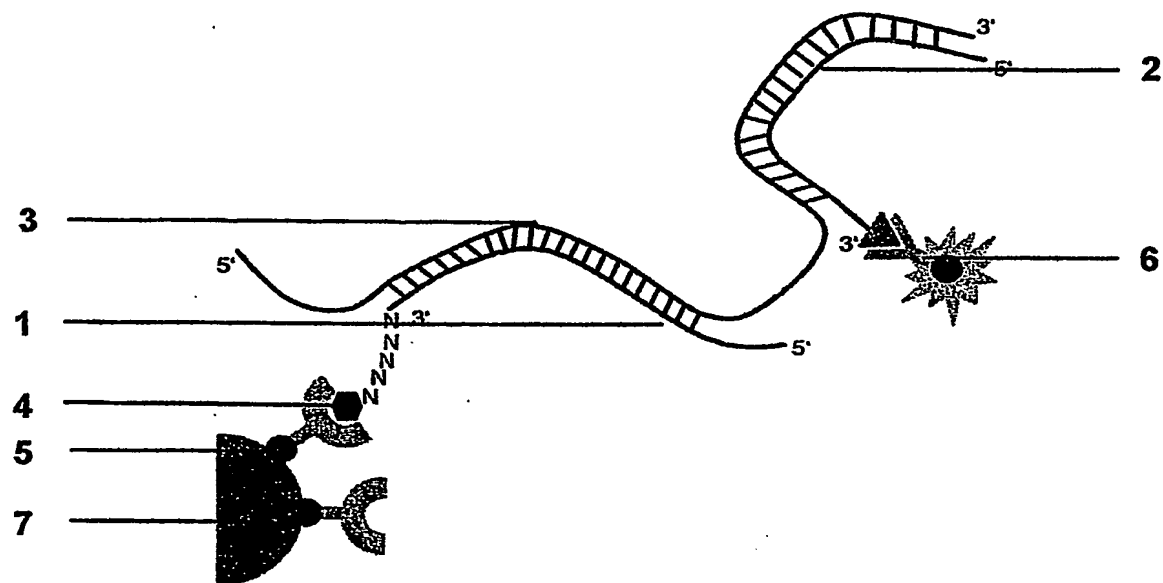


Fig. 1

Sequenzprotokoll

Allgemeine Angaben:

Anmelder:

Name: Antje Breitenstein
Strasse: Schillerstr. 29
Ort: Halle/S.
Land: Deutschland
Postleitzahl: 06114
Telefon: 0345-6786730
e-mail: antje.breitenstein@scanbec.com

Bezeichnung der Erfindung: Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella

Anzahl der Sequenzen: 8

Computerlesbare Fassung:

Datenträger: Diskette
Computer: IBM PC-kompatibel
Betriebssystem: Windows
Software: Microsoft Word

Angaben zu Seq. ID-No. Legpneu 1:

Sequenzcharakteristika:

Länge: 19 Basenpaare
Art: DNA-Oligonukleotid
Strangform: Einzelstrang
Topologie: linear

Hypothetisch: nein

Anti-Sense: ja

Ursprüngliche Herkunft:

Organismus: Legionella pneumophila
Zelltyp: Einzelliger Organismus

Merkmal: synthetisches Oligonukleotid gegen 16S rRNA
Lage: 575....594

Sequenzbeschreibung:

Seq ID-No. Legpneu 1: TCGCCGCCCTCTGTATCG

Angaben zu Seq. ID-No. legpneu 2:

Sequenzcharakteristika:

Länge: 18 Basenpaare
Art: DNA-Oligonukleotid
Strangform: Einzelstrang
Topologie: linear

Hypothetisch: nein

Anti-Sense: ja

Ursprüngliche Herkunft:

Organismus: Legionella pneumophila
Zelltyp: Einzelliger Organismus

Merkmal: synthetisches Oligonukleotid gegen 16S rRNA
Lage: 626....643

Sequenzbeschreibung:

Seq ID-No. legpneu 2: ATCTGACCGTCCCAGGTT

Angaben zu Seq. ID-No. legfeel 1:

Sequenzcharakteristika:

Länge: 20 Basenpaare
Art: DNA-Oligonukleotid
Strangform: Einzelstrang
Topologie: linear

Hypothetisch: nein

Anti-Sense: ja

Ursprüngliche Herkunft:

Organismus: Legionella feelei
Zelltyp: Einzelliger Organismus

Merkmal: synthetisches Oligonukleotid gegen 16S rRNA
Lage: 840....859

Sequenzbeschreibung:

Seq ID-No. legfeel 1: GCGCCACTAACCTCATTCAT

Angaben zu Seq. ID-No. legfeel 2:

Sequenzcharakteristika:

Länge: 20 Basenpaare
Art: DNA-Oligonukleotid

Strangform: Einzelstrang
Topologie: linear

Hypothetisch: nein

Anti-Sense: ja

Ursprüngliche Herkunft:
Organismus: Legionella feelei
Zelltyp: Einzelliger Organismus

Merkmal: synthetisches Oligonukleotid gegen 16S rRNA
Lage: 575....594

Sequenzbeschreibung:
Seq ID-No. legfeel 2: TATACAACCACCTACGCACC

Angaben zu Seq. ID-No. legjor 1:

Sequenzcharakteristika:
Länge: 20 Basenpaare
Art: DNA-Oligonukleotid
Strangform: Einzelstrang
Topologie: linear

Hypothetisch: nein

Anti-Sense: ja

Ursprüngliche Herkunft:
Organismus: Legionella jordanis
Zelltyp: Einzelliger Organismus

Merkmal: synthetisches Oligonukleotid gegen 16S rRNA
Lage: 192....211

Sequenzbeschreibung:
Seq ID-No. legjor 1: CTTACGGTCCCCAGCTTTTT

Angaben zu Seq. ID-No. legjor 2:

Sequenzcharakteristika:
Länge: 20 Basenpaare
Art: DNA-Oligonukleotid
Strangform: Einzelstrang
Topologie: linear

Hypothetisch: nein

Anti-Sense: ja

Ursprüngliche Herkunft:

Organismus: *Legionella jordanis*

Zelltyp: Einzelliger Organismus

Merkmal: synthetisches Oligonukleotid gegen 16S rRNA

Lage: 435....454

Sequenzbeschreibung:

Seq ID-No. legjor 2: CCACTCCTCCCCACTGAAAG

Angaben zu Seq. ID-No. legall 11:

Sequenzcharakteristika:

Länge: 19 Basenpaare

Art: DNA-Oligonukleotid

Strangform: Einzelstrang

Topologie: linear

Hypothetisch: nein

Anti-Sense: ja

Ursprüngliche Herkunft:

Organismus: *Legionella* spp.

Zelltyp: Einzelliger Organismus

Merkmal: synthetisches Oligonukleotid gegen 16S rRNA

Lage: 433....451

Sequenzbeschreibung:

Seq ID-No. legall 1: CCTCCTCCCCACTGAAAGT

Angaben zu Seq. ID-No. legall 22:

Sequenzcharakteristika:

Länge: 20 Basenpaare

Art: DNA-Oligonukleotid

Strangform: Einzelstrang

Topologie: linear

Hypothetisch: nein

Anti-Sense: ja

Ursprüngliche Herkunft:

Organismus: *Legionella* spp.

Zelltyp: Einzelliger Organismus

Merkmal: synthetisches Oligonukleotid gegen 16S rRNA
Lage: 983....1001

Sequenzbeschreibung:
Seq ID-No. legall 22: CACTGTATGTCAAGGGTAGG